

Оригинален труд

РЕНОПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКТИ НА ДВОЈНАТА БЛОКАДА НА РЕНИН-АНГИОТЕНЗИН СИСТЕМОТ СО КАНДЕСАРТАН И ПЕРИНДОПРИЛ КАЈ ДИЈАБЕТИЧНА НЕФРОПАТИЈА ИНДУЦИРАНА СО СТРЕПТОЗОТОЦИН

RENOPROTECTIVE EFFECTS OF DUAL BLOCKADE OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM WITH CANDESARTAN AND PERINDOPRIL IN STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC NEPHROPATHY

Јасмина Тројачанец, Димче Зафиров, Круме Јаковски, Елена Костова, Марија Петрушевска, Трајан Балканов, Игор Кикерков и Никола Лабачевски

Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Медицински факултет, Скопје, Република Македонија

Апстракт

Вовед. Инхибицијата на ренин-ангиотензин системот (RAS) манифестира ренопротективни ефекти независно од намалувањето на крвниот притисок. Повеќе студии сугерираат дека комбинираната терапија со инхибитор на конвертирачкиот ензим на ангиотензин (АКЕ-И) и рецепторните блокатори на ангиотензин (ARBs) остварува поголем антипротеинуричен ефект отколку монотерапијата, поради подолгата и покомплетна блокада на РАС. Цел на оваа студија беше да се процени дали комбинираната терапија со периндоприл и кандесартан во пониски дози отколку при монотерапија, ќе обезбеди поголема ренопротекција кај дијабетична нефропатија индуцирана со стрептозотоцин (STZ).

Методи. Во студијата беа користени Wistar-стаорци (n=125). Индукцијата на дијабет беше направена со еднакратна i.p. администрација на STZ (60 mg/kg). Дијабетичните стаорци (n=100) со рандомизација беа поделени да примаат плацебо, ARB-Candesartan (5 mg/kg/ден), ACE-I Perindopril (6 mg/kg/ден), или комбинација на ниски дози на кандесартан+периндоприл (2,5 mg/kg/ден и 3 mg/kg/ден), од 4-12 недела. Патолошките промени во бубрежите беа испитувани со оптички и трансмисионски електронски микроскоп.

Резултати. Екскрецијата на албумини, односот тежина на бубрег/телесна тежина и реналните структурни промени беа сигнификантно зголемени кај нетретирани дијабетични стаорци во споредба со нормалната контролна група на стаорци. Третманот со кандесартан, периндоприл или

со двата лека заедно сигнификантно ги намали овие промени. Додавањето на кандесартан на третманот со периндоприл беше поефикасно во однос на намалувањето на реналните структурни промени и подобрување на реналната функција во споредба со монотерапијата со двата лека.

Заклучок. Комбинираната терапија со ниски дози на ACE-I и ARB обезбедува додатна корист во остварувањето на супериорни ренопротективни ефекти на дијабетичен модел на нефропатија, веројатно поради двојниот инхибиторен ефект на RAS.

Клучни зборови: стрептозотоцин, двојна блокада на РАС, ренопротективни ефекти, дијабетична нефропатија, стаорци

Abstract

Introduction. Renin-angiotensin system (RAS) inhibition exerts a renoprotective effect independent of blood pressure reduction. Several studies suggest that combination therapy with angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE-I) and angiotensin receptor blockers (ARBs) provides a greater antiproteinuric effect than monotherapy, perhaps because of more prolonged and complete RAS inhibition. The aim of the present study was to determine if a combination therapy with perindopril and candesartan at lower doses than monotherapy would confer greater renoprotection in streptozotocin (STZ) induced diabetic nephropathy.

Methods. Wistar rats (n=125) were used in this study. Diabetes was induced by a single i.p. injection of STZ (60 mg/kg). The diabetic rats (n=100) were randomly assigned to receive vehicle, ARB-Candesartan (5 mg/kg/per d), ACE-I-Perindopril (6 mg/kg/per d), or a combination of low dose Candesartan+Perindopril (2,5 mg/kg/per d and 3 mg/kg/per d) respectively, from weeks 4-12. Pathological changes of the kidney were examined with optical and transmission electron microscope.

Results. Albumin excretion rate, kidney/body weight ratio and renal structural changes increased significantly in untreated diabetic rats compared to normal control rats. Treatment with candesartan, perindopril, or both decreased these changes. Addition of the candesartan to perindopril was more effective in reducing renal structural changes and improvement of renal function than monotherapy with either drug. **Conclusion.** Combination therapy has the additional benefit of requiring only low doses of ACE-I and ARBs to achieve superior renoprotective effects in this diabetic nephropathy model, possibly due to dual inhibitory effect on the RAS.

Key words: Streptozotocin, dual blockade of RAS, renoprotective effects, diabetic nephropathy, rats

Вовед

Дијабетичната нефропатија е една од најчестите и најсерозни компликации на дијабетот, за која сè уште нема адекватна медикаментозна терапија. Механизмите за настанувањето на оштетување на бубрезите со сигурност не се утврдени, но најчесто се спомнуваат: интеракциите помеѓу високата гликемија, васкуларно-ендотелниот фактор на раст, ангиотензин II (АТ-II), ендотелинот, крајните продукти на гликозилацијата, TGF- β , вклучувајќи ги хемодинамските нарушувања во бубрежната микроциркулација и структурните промени во гломерулите. Задебелувањето на гломеруларната базална мембрана (ГБМ) и експанзијата на мезангијалниот матрикс претставуваат главни патохистолошки промени кај дијабетичната нефропатија [1-4]. Докажано е дека акумулацијата на мезангијалниот матрикс ја редуцира капиларната површина достапна за филтрација, при што придонесува за прогресивно губење на бубрежната функција [4]. Бубрежната инсуфициенција, исто така, може да се јави и како резултат на тубулоинтерстицијалната фиброза, која од своја страна дополнително ја интензивира протеинуријата [5,6]. Познавајќи го патофизиолошкиот механизам на настанување на дијабетична нефропатија се издвојуваат неколку групи лекови кои веќе се употребуваат или би можеле да се употребуваат во превенцијата и третманот на дијабетичните нефропатии. Посебно се интересни лековите коишто делуваат поволно на хемодинамските нарушувања кои се присутни кај дијабетичната нефропатија, како што се инхибиторите на ангиотензин конвертирачкиот ензим (АКЕ) и ангиотензин рецепторните блокатори (ARBs). Во последните неколку години интензивно се испитува примената на двојната блокада на ренин-ангиотензин системот со АКЕ-инхиби-

тор и АТ-II рецепторен блокатор (ARBs) во третманот на разни кардиваскуларни заболувања, како и кај некои ренални заболувања. Се смета дека рационалноста од употребата на двојната блокада на RAS претставуваат различните места на дејствување на АКЕ-инхибиторите и ARBs, што резултира со синергистичка блокада на ренин ангиотензин системот (RAS) која не може да се постигне со монотерапија само со АКЕ-инхибитор, односно ARBs. АКЕ-инхибицијата го намалува создавањето на ангиотензин II преку блокада на двата рецептора A_1 и A_2 и деградацијата на брадикинин, кој е јак вазодилататор [7]. Меѓутоа, ангиотензин II може да се создаде и преку други независни патишта како што се химаза, тонин, катепсин Г, што резултира со некомплетна блокада и создавање на ангиотензин II [8]. Се смета дека повеќе од 40% од ангиотензин II се создава преку други патишта кои не се посредувани преку АКЕ. Нагорна регулација на химазата неодамна е регистрирана кај хипертензивни пациенти со дијабетес мелитус тип 2 и нефропатија [9]. Ваквата некомплетна блокада, всушност може да ги објасни наодите што покажуваат дека плазматското ниво на ангиотензин II се враќа на нормално ниво по хроничен третман со АКЕ-инхибитори (таканаречен "ACE-escape" феномен) [10,11].

Теоретски, третманот со ARBs може да резултира со покомплетна блокада на несаканите дејства на ангиотензин II кое се остваруваат преку рецепторите од тип 1. Поради тоа, се смета дека комбинираниот третман со АКЕ-инхибитори и ARBs може да овозможи синергистичка и покомплетна блокада на RAS.

Основната цел на оваа студија беше да се проценат ренопротективните ефекти на двојната блокада на ренин-ангиотензин-системот со комбинацијата периндоприл и кандесартан, во третманот на експериментално индуцираната дијабетична нефропатија со стрептозотоцин (СТЗ) во споредба со монотерапијата со двата лека.

Материјал и методи

Експериментален модел

За изведување на експериментите беа користени 125 машки и женски нормотензивни стаорци од сојот Wistar, на возраст од 9-11 недели, со телесна тежина од 160-300 g.

Влијанието на надворешните фактори на бубрежната функција беа минимизирани со стандардизирана грижа на животните и инјектирање на еквивалентни количества на течност за администрација.

Индукција на дијабет и дијабетична нефропатија

Со цел да се предизвика дијабет кај стаорците еднократно интраперитонално беше администриран стрептозотидин (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Germany) во доза од 60 mg/kg/t.t. растворен во 0,1 M цитратен пуфер (pH 4,5). Развојот на дијабет беше потврден по 72 часа со одредување на нивото на гликоза во крвта со користење на монитор за крвна гликоза (Accu-Chek, Roche Diagnostic, Germany). Крвните примероци за одредување на гликозата беа добиени со земање на крв од опашката. Во студијата беа вклучени стаорците кај кои нивото на гликоза во крвта беше ≥ 11 mmol/L, на гладно (наутро). Во наредните 4 недели, за да се развие дијабетична нефропатија, животните беа оставени во дијабетична состојба без никаков третман.

За да се одговори на поставените цели, стаорците (n=100) по случаен избор беа поделени во 4 групи (STZ, STZ+CAN, STZ+PER and STZ+CAN+PER). За да се проценат симптомите и знаците на дијабетичната нефропатија, STZ групата стаорци (n=25) беше оставена без третман, во следните 8 недели. За процена на ефектот на третманот само со ARBs кандесартан (CAN), кај STZ+CAN групата на дијабетични стаорци (n=25), беше администриран кандесартан во доза од 5 mg/kg/ден орално, од 4-12 недела. За процена на ефектот на третманот само со АКЕ инхибиторот периндоприл (PER) кај STZ+PER групата на дијабетични стаорци (n=25), периндоприл беше администриран во доза од 6 mg/kg/ден орално, од 4-12 недела. За процена на терапискиот ефект на комбинацијата на ARBs и АКЕ инхибитор, кај STZ+CAN+PER групата на дијабетични стаорци (n=25), кандесартан и периндоприл беа администрирани во дози од 2,5 mg/kg/ден, односно 3 mg/kg/ден, перорално, од 4-12 недела. Контролната група на стаорци (недијабетични стаорци) (n=25) примаше само физиолошки раствор, во ист волумен и временски интервали како и групите на животни кои ги примаа испитуваните лекови.

Параметри за процена на оштетувањата на функцијата на бубрежната функција

Нивото на гликоза во крвта се одредуваше пред почетокот на испитувањето, 72 часа по апликацијата на стрептозотидин и по 4, 8 и 12 недели.

Телесната тежина на испитуваните животни беше мерена во тек на целото испитување во неделни интервали.

За одредување на *диурезата и количината на албумини во урината* беа користени метаболни кафези. Присуството на уринарни албумини во примероците од 24-часовната урина беше вршено со употреба на автоанализатор (Cobas Integra

400 Plus; Roche Diagnostics, Germany). Овие тестови беа изведени пред почетокот на студијата (0 ден), и по 4, 8, и 12 недели од почетокот на студијата. *Хистопатолошка анализа на бубрежното ткиво и процена на бубрежни оштетувања*: По 4, 8 и 12 недели од администрацијата на STZ, по 7 животни од секоја испитувана група, беа жртвувани под општа анестезија индуцирана со интраперитонална инјекција на пентобарбитал (50 mg/kg t.t.; Boehringer Ingelheim), при што беше отворена стомачната празнина и двта бубрези беа отстранети.

Соодносот тежина на бубреж/телесна тежина беше одредуван на крајот од испитувањето, со користење на вредностите за тежината на бубрегот (mg) и телесната тежина (g) од мерењата направени по 12 недели.

Земените бубрежни примероци во краток временски интервал беа дисецирани и непосредно фиксирани во 10% пуфериран формалин, а потоа вклопени во парафин; најмалку 6 пресеци со дебелина од 4-6 μ m беа направени и истите беа боени со хематоксилин и еозин, PAS, Silver methenamine Jones и TrichromeMason.

Промените во бубрезите беа анализирани со методот на двојна слепа контрола.

Гломерулосклеротичен индекс (GSI): за евалуација на степенот на гломерулосклероза беа анализирани 20 големи видни полиња од секој бубрег ($\times 200$) на светлосен микроскоп (Nikon, Japan) со помош на систем за анализа на слика LUCIA. Степенот на склероза за секој гломерул беше субјективно одреден со користење на семиквантитативен метод: степен степен 0=нормални гломерули (нема оштетување); степен 1=склеротични површини до 25% (минимална склероза); степен 2=склеротична површина од 25-50% (умерена склероза); степен 3=склеротична површина од 50-75% (умерено-тешка склероза); и степен 4=склеротична површина од 75-100% (тешка склероза).

Гломерулосклеротичниот индекс беше пресметан со користење на следната формула:

$$GSI = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) / n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4$$

каде што n_x е број на гломерули од секој степен на гломеруларна склероза [12].

Тубулоинтерстицијален скор: за евалуација на промените во тубулоинтерстицијалниот компартман, исто така беа анализирани 20 големи видни полиња од секој бубрег ($\times 200$) на светлосен микроскоп (Nikon, Japan) со помош на систем за анализа на слика LUCIA.

Тубулоинтерстицијалните промени беа субјективно одредени со користење на семиквантитативен метод: степен степен 0=нормална површина (нема оштетување); степен 1=површини на тубуларни епи-

телни клетки со оток, вакуолизација, некроза, десквамација помала од 50% (лесен степен на гломерулосклероза); степен 2=површни со лезии поголеми од 50% со или без фокални промени на S3 сегментот и умерена интерстицијална фиброза; степен 3=површни со лезии од 100% со присуство на апоптоза во тубуло-интерстицијалниот компартман. *Електронска микроскопија*: за детална процена и карактеризација на бубрежните промени, само од STZ групата стаорци беа земени примероци од бубрежно ткиво со големина од 1-2mm², кои по постапка на депарафинација и рехидрација беа постфиксирани во 1% OsO₄ 1 час, а потоа обработени по постапка за вклопување во Durcupan-ска смола. Полутенките пресеци беа боени со Toluidine blue, додека ултратенките пресеци добиени на ултрамикротом (PT-PC PowerTome Ultramicrotomes-RMC Products), беа контрастирани на автостејнер (QG-3100 Automated TEM Stainer-RMC Products) за ултратенки пресеци со Uranil acetate и Lead citrate. Примероците потоа беа анализирани на трансмисионен електронски микроскоп (JEOL 1400, JAPAN) поврзан со дигитална камера (Veleta TEM Camera, Olympus, Germany) и анализирани со iTEM software v.5.2.

Статистичка анализа

Своите резултати беа изразени како средна вредност \pm SD. За тестирање на повеќе од две групи беше користена Kruskal-Wallis-ова анализа на варијанса, следена со Mann-Whitney U-тест за да се одредат

разликите на групите. Нивото на статистичката значајност се однесува за р-вредности помали од 0.05.

Резултати

Телесна тежина

Кај групата на недијабетични стаорци (контролна група) имаше континуирано, постепено зголемување на телесната тежина во текот на студијата. Кај стаорците со STZ-индуциран дијабет, хипергликемијата беше проследена со сигнификантно намалување на телесната тежина во споредба со недијабетичните стаорци (Табела 1).

На крајот од студијата, по 12 недели, телесната тежина кај STZ-групата на стаорци беше намалена за 14,9% ($p < 0,05$) во споредба со базалните вредности. Третманот со кандесартан (5 mg/kg/ден) или периндоприл (6 mg/kg/ден) само делумно го спречи намалувањето на телесната тежина кај дијабетичните стаорци. На крајот од студијата, просечната телесна тежина кај овие групи на животни беше зголемена за 7,5%, односно 4,3%, во споредба со базалните вредности. Двојната блокада на RAS со кандесартан и периндоприл додатно ја превенираше загубата на телесна тежина, при што телесната тежина на крајот од испитувањето кај оваа група на животни беше зголемена за 19,4% во споредба со базалните вредности (Табела 1).

Табела 1. Просечни вредности на телесната тежина кај експерименталните групи во текот на студијата

	Телесна тежина (g)			
	0-Ден	4-Недели	8-Недели	12-Недели
<i>Контролна гр.</i>				
X	178,08	194,75	215,80	238,33
SD	20,69	22,43	18,10	25,88
<i>STZ</i>				
X	180,78	176,61 ^a	168,33 ^a	158,92 ^a
SD	20,19	23,61	24,36	18,40
<i>STZ+CAN</i>				
X	176,07	172,80 ^a	176,15 ^a	189,20 ^{a,b}
SD	17,14	15,74	20,46	28,69
<i>STZ+PER</i>				
X	182,42	175,50 ^a	173,55 ^a	190,27 ^{a,b}
SD	25,14	29,56	27,25	21,02
<i>STZ+CAN+PER</i>				
X	179,60	176,87 ^a	189,55 ^{ab}	214,50 ^{a,b,c}
SD	15,60	20,90	19,98	22,54

^a<0,05 vs Контрола, ^b<0,05 vs STZ, ^c<0,05 vs STZ+PER and STZ+CAN

Диуреза

По 4 недели од администрацијата на STZ, кај дијабетичните стаорци беше евидентирано изразено и сигнификантно ($p < 0,05$) зголемување на во-

луменот на диурезата во споредба со контролната група на стаорци. Овие вредности кај STZ групата на стаорци додатно беа зголемени по 8 недели, а максимално изразени по 12 недели од администрацијата на STZ. Третманот со кандесартан и

периндоприл, применети како монотерапија, само лесно го намали волуменот на диуреза, но тоа не беше статистички сигнификантни во ниту една фаза од студијата ($p > 0,05$). За разлика од тоа, двојната блокада на RAS по 8 и 12 недели, доведе до ста-

тистички сигнификантно ($p < 0,05$) намалување на волуменот на диуреза во споредба со STZ-групата на стаорци, како и во однос на групите на стаорци кои беа третирани само со кандесартан (STZ+CAN), односно периндоприл (STZ+PER) (Табела 2).

Табела 2. Просечни вредности на волуменот на диуреза кај експерименталните групи во текот на студијата

	Волумен на диуреза (ml)			
	0-Ден	4-Недели	8-Недели	12-Недели
Контролна гр.				
X	8,86	9,11	7,71	8,75
SD	1,35	2,15	2,29	1,83
STZ				
X	7,86	16,89 ^a	20,57 ^a	21,29 ^a
SD	1,95	3,59	4,39	6,73
STZ+CAN				
X	8,29	18,25 ^a	17,88 ^a	17,14 ^a
SD	2,21	3,20	4,19	5,81
STZ+PER				
X	7,14	18,10 ^a	18,13 ^a	17,86 ^a
SD	1,57	4,56	4,79	3,53
Min	5,00	11,00	13,00	13,00
Max	10,00	25,00	24,00	23,00
STZ+CAN+PER				
X	9,13	19,20 ^a	15,75 ^{a,b}	13,71 ^{a,b,c}
SD	1,73	3,94	2,96	3,04

^a $<0,05$ vs Контролна група, ^b $<0,05$ vs STZ, ^c $<0,05$ vs STZ+PER and STZ+CAN

Албуминурија

Администрацијата на STZ, еднократно, *i.p.* во доза од 60 mg/kg/t.t., резултираше со сигнификантна ($p < 0,05$) албуминурија веќе по 4 недели. Просечните вредности на албумини во урината кај STZ-групата стаорци додатно беа зголемени по 8 недели, а својот максимум го достигнаа по 12 недели од администрацијата на STZ. Албуминуријата

беше сигнификантно намалена со сите три третмани во споредба со STZ-групата стаорци. Кандесартан и периндоприл покажаа еднаква ефикасност во однос на намалувањето на протеинуријата. Двојната блокада на RAS додатно ја намали протеинуријата во споредба со монотерапијата само со кандесартан, односно периндоприл (Табела 3). Компарацијата на екскрецијата на албумини во урина по 8 и 12 недели помеѓу трите третмани кои

Табела 3. Ефекти на третманот со кандесартан, периндоприл и кандесартан+периндоприл на екскрецијата на албумини во урина кај стаорци со STZ-индуцирана дијабетична нефропатија

	Албумини во урина (mg/24h)			
	0-Ден	4-Недели	8-Недели	12-Недели
Контролна гр.				
X	0,490	0,504	0,483	0,496
SD	0,118	0,120	0,109	0,116
STZ				
X	0,520	1,799 ^a	2,523 ^a	3,316 ^a
SD	0,158	0,775	0,824	0,822
STZ+CAN				
X	0,478	1,834 ^a	1,523 ^{a,b}	1,236 ^{a,b}
SD	0,127	0,796	0,556	0,505
STZ+PER				
X	0,532	1,676 ^a	1,434 ^{a,b}	1,309 ^{a,b}
SD	0,140	0,596	0,591	0,535
STZ+CAN+PER				
X	0,525	1,935 ^a	1,165 ^{a,b}	0,817 ^{a,b,c}
SD	0,110	0,758	0,423	0,310

^a $<0,05$ vs Control, ^b $<0,05$ vs STZ, ^c $<0,05$ vs STZ+PER and STZ+CAN

дејствуваат преку блокада на RAS, покажа статистички сигнификантно позитивен ефект на двојната блокада на RAS со комбинацијата кандесартан/периндоприл во намалувањето на протеинуријата во однос на монотерапијата со едниот или другиот лек ($p < 0,05$) (Табела 3).

Однос \bar{x} тежина на бубрег (mg)/ \bar{x} телесна тежина (g)

На крајот од студијата, кај STZ-групата стаорци,

евидентно беше сигнификантно зголемување на вредностите на односот тежина на бубрег/телесна тежина ($5,41 \pm 0,69$) во однос на контролната група на стаорци ($3,20 \pm 0,29$) ($p < 0,05$). Монотерапијата со кандесартан (STZ+CAN) и периндоприл (STZ+PER) иако сигнификантно ($p < 0,05$), само делумно манифестираше ефект во превенцијата на зголемувањето на вредностите на односот тежина на бубрег/телесна тежина. Третманот со комбинацијата на кандесартан/периндоприл (STZ

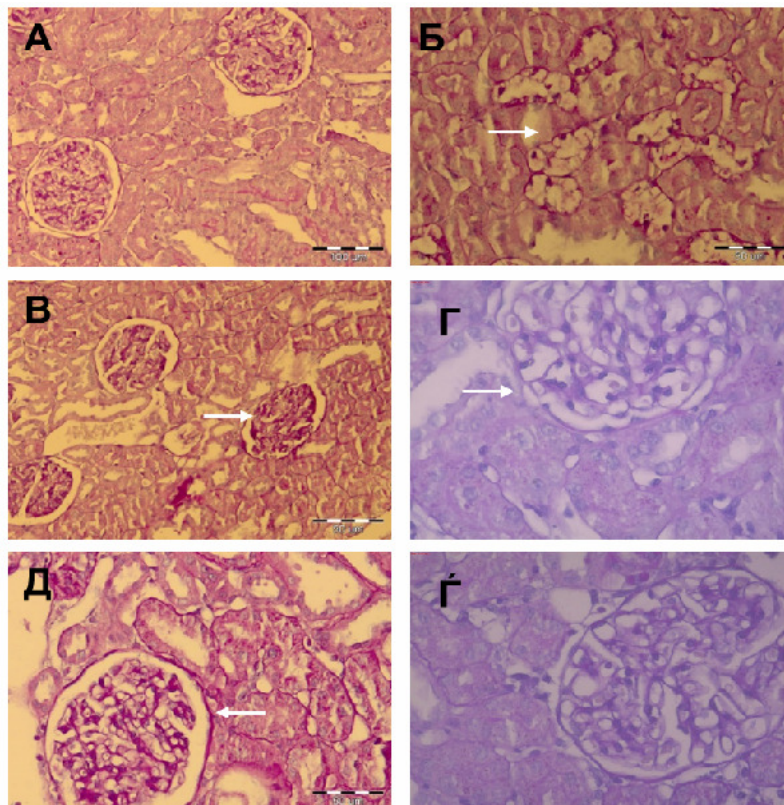
Табела 4. Просечни вредности на односот тежина на бубрег/телесна тежина по 12 недели од администрацијата на стрептозотозин

	Однос Тежина на бубрег/Телесна тежина mg/g (12 недела)				
	Контролна гр.	STZ	STZ+CAN	STZ+PER	STZ+CAN+PER
X	3,20	5,41 ^a	4,31 ^{a,b}	4,45 ^{a,b}	3,74 ^{a,b,c}
SD	0,29	0,69	0,48	0,39	0,25
Min	2,81	4,40	3,73	3,90	3,42
Max	3,68	6,49	5,50	5,11	4,31

^a $< 0,05$ vs Контролна гр., ^b $< 0,05$ vs STZ, ^c $< 0,05$ vs STZ+PER and STZ+CAN

+CAN+PER) покажа дополнителен ефект во превенцијата на зголемување на вредностите на односот тежина на бубрег/телесна тежина, при што просечните вредности изнесуваа $3,74 \pm 0,25$ (Табела 4). Компаративната статистичка анализа на вред-

ностите на односот тежина на бубрег/телесна тежина кај STZ+CAN и STZ+PER групите покажа сличен ефект без сигнификантни разлики помеѓу двата третмани ($p > 0,05$).



Сл. 1. Хистопатолошки наод на бубрезите од недијабетични стаорци, од стаорци со дијабет индуциран со STZ (без третман), дијабетични стаорци третирани со кандесартан, периндоприл и комбинацијата кандесартан/периндоприл. Примероците се боени со PAS-реагенс. Зголемување $\times 100$ и $\times 200$. (А) Недијабетични стаорци 12 недела. (Б) Нетретирани дијабетични стаорци 8 недела. (В) Нетретирани дијабетични стаорци 12 недела, со гломеруларни оштетувања, задебелена гломеруларна базална мембрана и тубуларен епител светлоклеточно променет заради интраклеточна акумулација на гликоген и тубуларна дилатација. (Г) Дијабетични стаорци третирани со кандесартан 12 недела. (Д) Дијабетични стаорци третирани со периндоприл 12 недела. (Г) Дијабетични стаорци третирани со комбинацијата кандесартан/периндоприл 12 недела

Од друга страна, компарацијата на комбинираната терапија со кандесартан и периндоприл во однос на монотерапијата со двата лека, покажа сигнификантни разлики во корист на комбинираната терапија ($p < 0,05$) (Табела 4).

Хистопатолошки испитувања и анализи

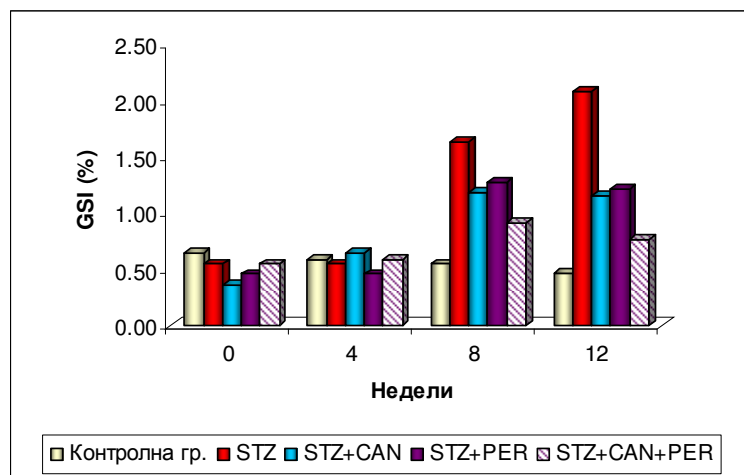
По 8 недели од администрацијата на стрептозоцин, кај STZ-групата дијабетични стаорци, хистопатолошките испитувањата со светлосен микроскоп покажаа присуство на умерен степен на гломерулопатија карактеризирана со задебелување на базалната мембрана, експанзија на мезангијалниот матрикс, артериоларна хијалиноза и инсудативни протеински депозити кои вршат опструкција (конгестија) на некои капилари. Слични, но од потежок степен гломеруларни оштетувања беа најдени кај истата група на животни по 12 недели. Освен тоа, хистопатолошките испитувања на бубрезите во кортикомедуларната регија покажаа знаци за проширен интерстициум со интерстицијална фиброза и дилатација на тубулите со атрофија на епителот. Кај некои бубрежни примероци беше присутна и вакуолизација на тубуларниот епител со дилатација на луменот од тубулите како и присуство на гликогени депозити. Крвните садови во бубрежниот паренхим микроскопски покажуваа медијална хипертрофија со лесен степен на интимално задебелување (Слика 1). Во групите на дијабетични стаорци кои примаа монотерапија со кандесартан (STZ+CAN) или периндоприл (STZ+PER), беа најдени слични проме

ни во гломерулите и тубулоинтерстицијалниот компартман како и кај STZ групата по 8 и 12 недели, со тоа што истите беа помалку изразени (Слика 1).

За разлика од тоа, во групата стаорци кај која беше применета двојна болкада на RAS (STZ+CAN+PER), кај најголем дел од анализираниите бубрежни примероци беше присутен само лесен степен на дијабетична гломерулопатија, со лесно изразени промени во тубулоинтерстициумот. Задебелувањето на базалната мембрана, гломерулосклерозата и промените во тубулоинтерстициумот беа значајно помалку изразени како во однос на STZ-групата, така и во однос на STZ+CAN и STZ+PER-групата. Исто така беше евидентирана и редукцијата на дебелината на артерискиот ѕид во зафатените крвни садови во однос на останатите 3 групи на дијабетични стаорци (Слика 1).

Гломерулосклеротичен индекс (GSI)

Вредностите на гломерулосклеротичниот индекс (GSI) беа сигнификантно зголемени кај STZ-групата по 8 недели ($1,636 \pm 0,674$), а уште повеќе на крајот од студијата ($2,077 \pm 0,862$). Помало зголемување на GSI беше регистрирано кај STZ+CAN и STZ+PER-групите по 8 и по 12 недели. Додатна превенција на зголемувањето на вредностите на GSI беше регистрирана кај STZ+CAN+PER групата, кај која просечните вредности по 8 и 12 недели изнесуваа $0,917 \pm 0,515$, односно $0,769 \pm 0,599$. Ваквите разлики се сигнификантни во однос на STZ групата како по 8 така и по 12 недели ($p < 0,05$) (Слика 2).



Сл. 2. Просечни вредности на гломерулосклеротичен индекс

Компаративната статистичка анализа на просечните вредности на GSI на крајот од испитувањето помеѓу испитуваните групи покажа сигнификантно ($p < 0,05$) пониски просечни вредности кај STZ+CAN, STZ+PER и STZ+CAN+PER групите во однос на соодветните просечни вредности кај STZ-

групата. Од друга страна, вредностите на GSI кај STZ+CAN+PER-групата беа сигнификантно пониски ($p < 0,05$) во однос на соодветните вредности кај STZ+CAN и STZ+PER-групите, додека вредностите кај STZ+CAN и STZ+PER не се разликуваа сигнификантно помеѓу себе ($p > 0,05$) (Табела 5).

Табела 5. Просечни вредности на гломерулосклеротичен индекс

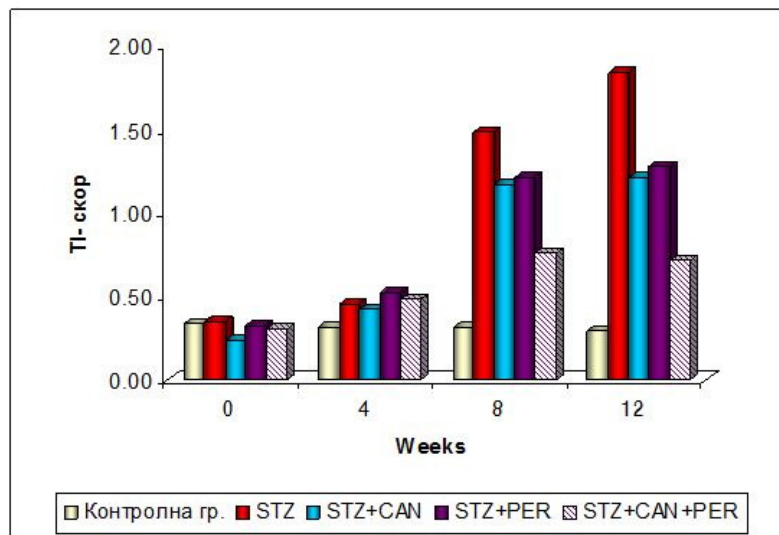
	<i>Гломерулосклеротичен индекс %</i>			
	0-Ден	4-Недели	8-Недели	12-Недели
Контролна гр.				
X	0,636	0,583	0,545	0,462
SD	0,505	0,515	0,522	0,519
STZ				
X	0,545	0,545	1,636 ^a	2,077 ^a
SD	0,522	0,522	0,674	0,862
STZ+CAN				
X	0,364	0,636	1,182	1,154
SD	0,505	0,505	0,405	0,555
STZ+PER				
X	0,455	0,455	1,273 ^{a,b}	1,214 ^{a,b}
SD	0,522	0,522	0,647	0,579
STZ+PER				
X	0,545	0,583	0,917 ^{a,b}	0,769 ^{a,b,c}
SD	0,522	0,515	0,515	0,599

^a<0,05 vs Контролна гр., ^b<0,05 vs STZ, ^c<0,05 vs STZ+PER and STZ+CAN

Тубулоинтерстицијален скор

Сигнификантно зголемување на просечните вредности на тубулоинтерстицијалниот скор кај STZ-групата беа најдени по 8 недели, а истите беа уште повеќе изразени на крајот од студијата во однос на контролната група ($p < 0,05$). Помало зголемување на просечните вредности на тубулоинтерстицијалниот скор беше регистрирано кај

STZ+CAN и STZ+PER групите во двата контролни прегледи по 8 и по 12 недели. Додатна превенција на зголемувањето на вредностите на тубулоинтерстицијалниот скор беше регистрирана кај STZ+CAN+PER групата, кај која просечните вредности по 8 недели изнесуваа $0,759 \pm 0,689$, а по 12 недели $0,708 \pm 0,624$. Ваквите разлики се сигнификантни во однос на STZ-групата како по 8 така и по 12 недели ($p < 0,05$) (Слика 3).

**Сл. 3.** Просечни вредности на тубулоинтерстицијален скор

Компарацијата на просечните вредности на тубулоинтерстицијалниот скор на крајот од испитувањето помеѓу испитуваните групи покажа сигнификантно ($p < 0,05$) пониски вредности кај STZ+CAN, STZ+PER и STZ+CAN+PER групите во однос на STZ групата. Од друга страна, вредностите на ту

булоинтерстицијалниот скор кај STZ+CAN+PER групата беа сигнификантно пониски ($p < 0,05$) во однос на соодветните вредности кај STZ+CAN и STZ+PER групите, додека вредностите кај STZ+CAN и STZ+PER не се разликуваа сигнификантно помеѓу себе ($p > 0,05$) (Табела 6).

Табела 6. Просечни вредности на тубулоинтерстицијален скор

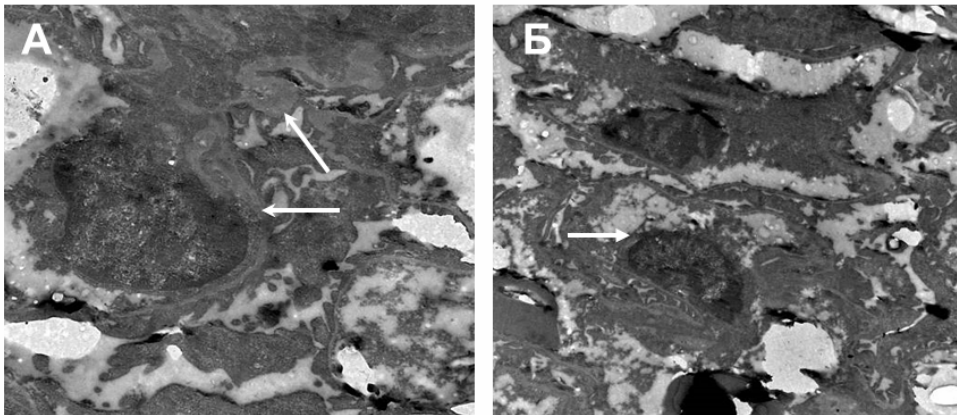
	<i>Тубулоинтерстицијален скор</i>			
	0-Ден	4-Недели	8-Недели	12-Недели
Контролна гр.				
X	0,333	0,308	0,310	0,292
SD	0,482	0,471	0,471	0,464
STZ				
X	0,348	0,448	1,483 ^a	1,840 ^a
SD	0,487	0,506	0,688	0,374
STZ+CAN				
X	0,231	0,423	1,172 ^{a,b}	1,208 ^{a,b}
SD	0,430	0,504	0,602	0,588
STZ+PER				
X	0,318	0,519	1,207 ^{a,b}	1,273 ^{a,b}
SD	0,477	0,509	0,559	0,631
STZ+PER				
X	0,304	0,480	0,759 ^{a,b,c}	0,708 ^{a,b,c}
SD	0,470	0,510	0,689	0,624

^a<0,05 vs Контролна гр., ^b<0,05 vs STZ, ^c<0,05 vs STZ+PER and STZ+CAN

Електронска микроскопија

Наодите од овие испитувања укажуваат на ренални оштетувања карактеристични за дијабетична нефропатија, со посебен акцент на промените во гломеруларната филтрациска бариера (гломеруларниот ендотел и подоцитите). Ултратруктурната анализа покажа нарушувања во гломеруларните висцерални епителни клетки,

манифестна како невоедначена фузија на подоцитните продолжетоци. Исто така, евиденто е и проширувањето на мезангијалниот матрикс со задебелување на гломеруларната базална мембрана поради депозити на базално-мембранозен склеротичен материјал. Во крвните садови на реналниот паренхим евидентна е медијална хипертофија со низок степен на задебелување на интимата (Слика 4).



Сл. 4. Електронска микрофотографија од стаорци со дијабет индуциран со STZ, 12 недела. (А и Б) Невоедначена фузија на подоцитните продолжетоци, и проширување на мезангијалниот матрикс со задебелување на гломеруларната базална мембрана (зголемување x20000)

Дискусија

Во оваа студија на експериментално индуциран дијабет, а последователно на тоа и дијабетична нефропатија, беа проценувани и компарирани ренопротективните ефекти на монотерапијата со кандесартан (претставник на ARB) и периндоприл (претставник на АКЕ-инхибиторите) во однос на комбинацијата кандесартан/периндоприл применети во ниски дози.

Еднократната администрација на STZ предизвика дијабет, со изразена албуминурија, проследена со лоша општа состојба, намалување на телесната тежина и зголемување на диурезата. Најголем дел од овие симптоми и знаци беа манифестни веќе по 4 недели, а истите беа поизразени по 8 односно 12 недели од администрацијата на STZ. На крајот од студијата, кај STZ-групата стаорци, евидентирано беше сигнификантно зголемување на вредностите на односот тежина на бубрег/телесна тежина во однос на контролната група на

стаорци, што укажува на значајни оштетувања на бубрезите. Потврда за развојот и прогресијата на дијабетичната нефропатија кај експерименталните животни несомнено претставуваат патохистолошките анализи на бубрежните примероци. Патохистолошките испитувањата со светлосен микроскоп по 8 недели кај дијабетичните стаорци покажуваат присуство на гломерулопатија карактеризирана со задебелување на базалната мембрана, експанзија на мезангијалниот матрикс, артериоларна хијалиноза како и инсудативни протеински депозити кои вршат опструкција на некои капилари. Слични, но од потежок степен беа патохистолошките промени на бубрезите кај истата група на животни по 12 недели од администрацијата на стрептозотоцин. Спроведените семиквантитативни анализи на гломерулите и тубулоинтерстицијалниот компартман исто така укажуваат на значајни нарушувања во гломерулите и тубулоинтерстицијумот кај испитуваните животни. Вредностите на гломерулосклеротичниот индекс и тубулоинтерстицијалниот скор по 8, а особено по 12 недели од администрацијата на стрептозотоцин беа за неколку пати повисоки во однос на контролната група, што укажува на развој на умерени до тешки нарушувања во гломерулите и тубулоинтерстицијумот. Овие наоди се во согласност со наодите на Nevin E., според кои гломерулопатијата всушност претставува најважна структурна промена кај дијабетичната нефропатија [13]. Освен тоа, хистопатолошките испитувања на бубрезите покажуваат и знаци за интерстицијална фиброза и тубуларна дилатација, што е во согласност со наодите од студијата на Huang *et al.*, во која кај дијабетични глвци се регистрирани гломеруларна хипертрофија, спорадична интерстицијална фиброза и тубуларна атрофија без прекумерно изразена гломеруларна склероза [14].

Монотерапијата со кандесартан или периндоприл почната 4 недели по администрацијата на стрептозотоцин резултираше само со парцијални ренопротективни ефекти. Кај двете групи на стаорци, иако сигнификантно намалени, по 8 и 12 недели од администрацијата на стрептозотоцин, сè уште беа лесно до умерено изразени албуминуријата и патохистолошките нарушувања во гломерулите и тубулоинтерстицијумот. За разлика од тоа, комбинираниот терапија со кандесартан и периндоприл, која овозможува двојна блокада на RAS, покажа сигнификантно поголеми ренопротективни ефекти во однос на монотерапијата со двата лека. Групата на стаорци кај која беше применета двојна блокада на RAS имаше само лесно изразена албуминурија и патохистолошки наод кој покажува само нарушувања од лесен степен. Анализата на бубрежните приме-

роци (гломерулосклеротичен индекс и тубулоинтерстицијален скор) по 8, а уште поизразено по 12 недели, покажа сигнификантно пониски вредности во однос на групите кои примаа монотерапија со еден од двата лека. Вредностите на овие параметри кај оваа експериментална група иако сигнификантно се разликуваа, беа блиску до вредностите регистрирани кај контролната група.

Порано, истражувањата во однос на молекуларните механизми на развојот на дијабетичната нефропатија и протеинуријата главно биле фокусирани на експанзијата на мезангијалниот матрикс и задебелувањето на гломеруларната базална мембрана како главни нарушувања кај дијабетичната гломерулопатија [4]. Меѓутоа, генезата на протеинуријата кај дијабетот не е целосно разјаснета со експанзијата на мезангијалниот матрикс. Како многу веројатна причина треба да се земат промените во гломеруло-филтрациската бариера, која што е составена од: гломеруларен ендотелиум, гломеруларна базална мембрана и подоцити (гломеруларни висцерални епителни клетки).

Гломеруларен ендотелиум: се смета дека ендотелијаната дисфункција резултира со протеинурија, која што се влошува под влијание на интрагломеруларниот хемодинамски стрес [15-16]. Меѓутоа, и покрај големите оштетувања кои можат да бидат присутни, гломеруларниот ендотелиум може да биде пречка за пермеабилноста на протеините [17,18].

Гломеруларна базална мембрана: задебелувањето и губењето на селективноста како резултат на дијабетот се смета дека може да бидат причина за појавата на протеинуријата [19,20]. Меѓутоа, губењето на селективноста на гломеруларната базална мембрана само делумно ја објаснува протеинуријата [21], со оглед на тоа што намалувањето на негативно наелектризираните протеоглици се појавува во покасната фаза на дијабетичната нефропатија, понекогаш долго по појавата на микроалбуминурија [22]. Ова доведува до заклучок дека финалната бариера за плазматските протеини всушност претставува тенката дијафрагма на подоцитите [23]. Резултатите од поголем број биоптични студии спроведени кај пациенти со дијабетес мелитус и неколку експериментални студии покажуваат дека функционалните и структурни оштетувања на подоцитите се јавуваат многу рано кај дијабетичната нефропатија [24-28].

Наодите од истражувањата спроведени со електронска микроскопија од оваа студија се во согласност со ваквите податоци и покажуваат дека кај експериментално индуцираната дијабетична нефропатија со стрептозотоцин, посебно изразени се нарушувањата во гломеруларните висцерал-

ни клетки, манифестни како невоедначена фузија на подоцитните продолжетоци.

Точната етиологија на оштетувањето и губењето на подоцитите кај дијабетичната нефропатија е сè уште недоволно разјаснета и спекулативна, но се смета дека во основа лежат два механизма и тоа: апоптоза на подоцитите и одлепување на подоцитите од гломеруларната базална мембрана и нивна елиминација со урината (подоцитопенија). Во одлепувањето и апоптозата на подоцитите, значајна улога може да има и зголеменото ниво и прекумерната активност на интрагломеруларниот трансформиращки фактор на раст (TGF- β), а посебно TGF- β 1 [29-31]. Податоците, за примарната улога на апоптозата кај хуманата дијабетична нефропатија се сè уште лимитирани. Меѓутоа, апоптозата, како еден од главните механизми во развојот на дијабетичната нефропатија е покажана во неколку *in vitro* и *in vivo* експериментални студии. При тоа, како главен фактор за развојот и индукцијата на апоптозата се издвојува ангиотензин-II. Уште во трудот на Suzuki J, *et al.*, е покажано дека ангиотензин-II поседува антипролиферативни и проапоптотички ефекти на васкуларните мазни мускулни клетки (VSMC) [32]. Резултатите од неколку студии покажуваат дека ангиотензин-II ја стимулира апоптозата не само во тубуларниот бубрежен компартман, туку и во гломерулите и интерстициумот. Истовремено, резултатите од овие студии покажуваат дека апоптозата индуцирана со ангиотензин-II може да се превенира со употреба на AT-1 блокатори (кандесартан) [33].

Во студијата на Menini S, *et al.*, изведена на експериментален модел на дијабетична нефропатија индуцирана со стрептозотозин кај стаорци е покажано дека една од главните патолошки промени, всушност претставува зголемената апоптоза во гломерулите, посебно изразена во подоцитите, во споредба со недијабетичните стаорци [34]. Постојат лимитиран број на експериментални студии на стаорци во кои било испитувано влијанието на комбинацијата АКЕ инхибитори/ARBs на реналните оштетувања кај дијабетична нефропатија индуцирана со стрептозотозин. Резултатите од овие испитувања покажале сигнификантно подобрување на реналната функција со комбинацијата во споредба со монотерапијата, во однос на клиренсот на креатининот, протеинуријата и реналната хистологија. Во однос на протеинуријата забележано е значајно намалување со комбинацијата АКЕ инхибитори/ARBs во однос на монотерапијата и тоа кај експерименталните модели каде што има сигнификантна протеинурија, за разлика од експерименталните модели каде што протеинуријата не била изразена како

што е кај хипертензивните ренални оштетувања [31,35-37]. Податоците добиени како од хуманите така и од анималните студии покажуваат комплексна слика во однос на потенцијалниот бенефит од третманот со комбинацијата АКЕ инхибитори/ARBs во остварувањето на ренопротективните ефекти. Се смета дека комбинацијата има подобри ефекти кај дијабетичната нефропатија и хиперпротеинуричните заболувања во однос на ефектот кај хипертензивните ренални оштетувања каде што овој третман нема додатен бенефит. Овие сознанија може да се должат на фактот што главна компонента во прогресијата на дијабетичната нефропатија е променетата рецепторна експресија на интареналниот RAAS [38, 39], што ѝ дава поголема можност на двојната блокада на RAAS за подобар ефект кај дијабетот во однос на другите заболувања. Што се однесува до протеинуријата, гломеруларниот притисок- кој е регулиран од RAAS-има големо значење и може да биде намален со комбинирана RAAS-блокада, со што се објаснуваат подобрите ефекти на комбинираната RAAS-блокада на протеинуријата [40].

Заклучок

Резултатите добиени и во оваа експериментална студија јасно потврдуваат дека двојната блокада на RAAS со ниски дози на АКЕ-инхибитор (периндоприл) и ARB (кандесартан) има синергистички ефект во остварувањето на ренопротективните ефекти. Таа манифестира сигнификантно поизразени ренопротективни ефекти во однос на монотерапијата со кој било од двата лека применети како монотерапија и би можела да претставува медикаментозна тераписка опција за третман на пациенти со дијабетична нефропатија.

Конфликт на интереси. Не е деклариран.

Литература

1. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007; 27: 195-207.
2. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1358-1373.
3. Kanwar YS, Wada J, Sun L, *et al.* Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233(1): 4-11.
4. Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, *et al.* Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1984; 74: 1143-1155.
5. Ziyadeh FN, Goldfarb S. The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1991; 39: 464-475.
6. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998; 339: 1448-1456.
7. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function: state of the art lecture. *Hypertension* 1989; 13: 658-667.

8. Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 2000; 32: 387-392.
9. Huang XR, Chen WY, Truong LD, Lan HY. Chymase is upregulated in diabetic nephropathy; implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1738-1747.
10. Van den Meiracker AH, Man in 't Veld AJ, Admiraal PJ, et al. Partial escape of ACE inhibition during prolonged ACE inhibitor treatment; does it exist and does it effect the antihypertensive response? *J Hypertens* 1992; 10: 803-812.
11. Nussberger J, Brunner DB, Wreber B, Brunner HR. Plasma angiotensins under sustained converting enzyme inhibition with enalapril in normal humans. *J Hypertens* 1985; 3(suppl): S269-S270.
12. Saito T, Sumithran E, Glasgow EF, Atkins RC. The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. *Kidney Int* 1987; 32: 691-699.
13. Nevin E, Selma Y, Melek O, et al. Effects of ACE inhibition on the expression of type IV collagen and laminin in renal glomeruli in experimental diabetes. *Acta Histochemica* 2004; 106 (4): 279-287.
14. Huang W, Yves G, Nadine B, et al. Genetically increased angiotensin I converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(23): 13330-13334.
15. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, et al. Albuminuria reflects widespread vascular damage: the Steno hypothesis. *Diabetologia* 1989; 32: 219-226.
16. Zatz R, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 5963-5967.
17. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F579-F596.
18. Deen WM. What determines glomerular capillary permeability? *J Clin Invest* 2004; 114: 1412-1414.
19. Kefalides NA. Basement membrane research in diabetes mellitus. *Coll Relat Res* 1981; 1: 295-299.
20. Isogai S, Mogami K, Shiina N, Yoshino G. Initial ultrastructural changes in pore size and anionic sites of the glomerular basement membrane in streptozotocin-induced diabetic rats and their prevention by insulin treatment. *Nephron* 1999; 83: 53-58.
21. Menne J, Park JK, Boehne M, et al. Diminished loss of proteoglycans and lack of albuminuria in protein kinase C-deficient diabetic mice. *Diabetes* 2004; 53: 2101-2109.
22. Vernier RL, Steffes MW, Sisson-Ross S, Mauer SM. Heparan sulfate proteoglycan in the glomerular basement membrane in type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992; 41: 1070-1080.
23. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253-307.
24. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthofer H. Nephropathy in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2969-2974.
25. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2063-2071.
26. Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 2002; 45: 1572-1576.
27. Mifsud SA, Allen TJ, Bertram JF, et al. Podocyte foot process broadening in experimental diabetic nephropathy: amelioration with renin-angiotensin blockade. *Diabetologia* 2001; 44: 878-882.
28. Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, et al. Expression of the slit diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1327-1332.
29. Ding G, Reddy K, Kapasi AA, et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F173-F180.
30. Schiffer M, Mundel P, Shaw AS, Bottinger EP. A novel role for the adaptor molecule CD2-associated protein in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 37004-37012.
31. Zoja C, Corona D, Gagliardini E, et al. Adding a statin to combination of ACE inhibitor and ARG normalizes proteinuria in experimental diabetes, which translates into full renoprotection. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: F1203-F1211.
32. Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, et al. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation* 2002; 106(7): 847-853.
33. Eskild-Jensen A, Paulsen LF, Wogensen L, et al. AT1 receptor blockade prevents interstitial and glomerular apoptosis but not fibrosis in pigs with neonatal induced partial unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292 (6): F1771-F1781.
34. Menini S, Iacobini C, Oddi G, et al. Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease. *Diabetologia* 2007; 50(12): 2591-2599.
35. Erman A, Veksler S, Gafter U, et al. Renin-angiotensin system blockade prevents the increase in plasma transforming growth factor beta 1 and reduces proteinuria and kidney hypertrophy in the streptozotocin-diabetic rat. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2004; 5(3): 146-151.
36. Toblli JE, DeRosa G, Cao G, et al. ACE inhibitor and angiotensin type I receptor antagonist in combination reduce renal damage in obese Zucker rats. *Kidney Int* 2004; 65(6): 2343-2359.
37. Zoja C, Coma D, Camozzi D, et al. How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multi-drug approach. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(12): 2898-2908.
38. Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, et al. Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney Int* 2000; 58(6): 2320-2330.
39. Wehbi GJ, Zimpelmann J, Carey RM, et al. Early streptozotocin-diabetes mellitus downregulates rat kidney AT2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(2): F254-F265.
40. Schmerbach K, Kalak P, Wengenmayer C, et al. Renal Outcome in Equipotent Antihypertensive Treatment with Telmisartan, Ramipril and in Combination in SHR-SP. *Rats Clin Lab* 2012; 58: 625-633.